

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA
NEFROLOGIA

Oligonucleotídeos *antisense*: o desenvolvimento de uma terapêutica seletiva

Lígia Denise Gonçalves de Sá Vieira

M
2018



OLIGONUCLEOTÍDEOS *ANTISENSE*: O DESENVOLVIMENTO DE UMA TERAPÊUTICA SELETIVA

Lígia Denise Gonçalves de Sá Vieira

up200605540@icbas.up.pt

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina
Apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
da Universidade do Porto

Artigo de Revisão Bibliográfica


Orientadora:

Prof.^a Doutora Luísa Lobato
Assistente Graduada Sênior de Nefrologia
do Centro Hospitalar do Porto
Professora Catedrática Convidada do Instituto de Ciências
Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Maio, 2018



Lígia Denise Gonçalves de Sá Vieira



Prof.ª Doutora Luísa Lobato

Resumo

Os oligonucleotídeos *antisense* são análogos de cadeias simples de ácidos nucleicos complementares a um ácido ribonucleico mensageiro específico (hibridização *Watson-Crick*), capazes de inibir a sua expressão e bloquear a síntese proteica. Existem duas classes de oligonucleotídeos *antisense*: os dependentes da RNase H, que induzem a degradação do ácido ribonucleico mensageiro, e os oligonucleotídeos *steric-blocker*, que inibem o processamento do ácido ribonucleico mensageiro (*splicing*) ou a síntese proteica. Assim, os oligonucleotídeos *antisense* constituem uma estratégia terapêutica seletiva nas doenças em que a síntese proteica está desregulada ou resulta na isoforma proteica mutada.

Após a sua descoberta em 1978, motivada para a inibição do vírus do sarcoma de *Rous*, assistiu-se ao desenvolvimento de novas gerações de oligonucleotídeos *antisense*, com maior estabilidade, potência e seletividade, permitindo a sua utilização na prática clínica real.

Nesta revisão, pretende-se abordar o mecanismo de atuação desta nova classe de fármacos, a evolução da farmacogenómica no seu desenvolvimento e, de modo sistemático, apresentar a aplicabilidade dos oligonucleotídeos *antisense* no tratamento da patologia renal, neurodegenerativa, hemato-oncológica e inflamatória. Esta terapêutica tem evidenciado segurança e eficácia em modelos animais e em ensaios clínicos, todavia a extrapolação para a prática clínica real é ainda o maior desafio no desenvolvimento científico.

Esta revisão baseou-se na pesquisa nas bases de dados eletrónicas *PubMed*, *MEDLINE* e *Embase*, sem restrição pelo ano de publicação. Recorreu-se ainda à base de dados *ClinicalTrials* (www.clinicaltrials.gov), à plataforma *UpToDate* e às orientações da Sociedade Europeia para Oncologia Médica (www.esmo.org/Guidelines). Foram ainda utilizados resumos de conferências quando eram relatados novos resultados clínicos ainda não publicados. O critério de seleção das publicações mais recentes foi a aplicabilidade à prática clínica. A última pesquisa foi realizada a 30 abril de 2018.

Palavras-chave: “*antisense oligonucleotides*”, “*cancer*”, “*clinical trials*”, “*genetic therapy*”, “*kidney*” e “*neurodegenerative*”.

Abstract

Antisense oligonucleotides are single-stranded nucleic acid analogs complementary to a specific messenger ribonucleic acid (Watson-Crick hybridization), capable of inhibiting its expression and blocking protein synthesis. There are two classes of *antisense* oligonucleotides: those dependent on RNase H, that induce messenger ribonucleic acid degradation, and steric-blocker oligonucleotides, that inhibit messenger ribonucleic acid processing (splicing) or protein synthesis. Thus, antisense oligonucleotides constitute a selective therapeutic strategy in diseases whose protein synthesis is dysregulated or results from a mutated protein isoform.

After its discovery in 1978, motivated for the inhibition of the Rous sarcoma virus, we witnessed the development of new generations of *antisense* oligonucleotides, with greater stability, potency and selectivity, allowing its use in real clinical practice.

This review intends to address the mechanism of action of this new class of drugs, the evolution of pharmacogenomics in its development and, in a systematic way, to present the applicability of *antisense* oligonucleotides in the treatment of renal, neurodegenerative, hemato-oncological and inflammatory pathology. This therapy has shown safety and efficacy in animal models and in clinical trials, however the extrapolation to the actual clinical practice is still the greatest challenge in the scientific development.

The review was based on the search in the electronic databases PubMed, *MEDLINE* and Embase, without restriction of year of publication. It was also used the register *ClinicalTrials* (www.clinicaltrials.gov), the UpToDate platform and the guidelines of the European Society for Medical Oncology (www.esmo.org/Guidelines). Conference summaries were also used when new unpublished clinical results were reported. The criteria for selection of the recent publications was the applicability to clinical practice. The last review was conducted on April 30, 2018.

Key-words: “*antisense oligonucleotides*”, “*cancer*”, “*clinical trials*”, “*genetic therapy*”, “*kidney*” and “*neurodegenerative*”.

Lista de Abreviaturas

Agt: Angiotensinogénio

ApoER2: Receptor da apolipoproteína E

CMV: Citomegalovírus

CTGF: Fator de crescimento do tecido conjuntivo

DA: Doença de Alzheimer

DFG: Débito de filtração glomerular

DRPAD: Doença renal poliquística autossómica dominante

eIF4E: Fator de iniciação eucariótico 4E

ERK: Cinase regulada por sinal extracelular

FDA: Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos

GESF: Glomeruloesclerose segmentar e focal

Hsp: Proteínas de choque térmico

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular do tipo 1

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

INF: Interferão

IRAK1: Cinase associada ao recetor de interleucina-1

IRF5: Fator regulador de interferão 5

LRA: Lesão renal aguda

MAPK: Proteína cinase ativada por mitogénio

MBG: Membrana basal glomerular

miRNA: microRNA

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

mTOR: Proteína alvo da rapamicina

ON: Oligonucleotídeos *antisense*

PCR: Proteína C-reativa

PIO: Pressão intra-ocular

SGLT2: Recetor co-transportador de sódio-glicose 2

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

STAT1: Transdutor de sinal e ativador de transcrição tipo 1

TAC: Tomografia axial computadorizada

TCP: Tubo contornado proximal

TGF β : Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TTR: Transtirretina

Índice

Introdução	1
Objetivos	1
Metodologia	2
Definição e Mecanismo de Atuação dos Oligonucleotídeos <i>Antisense</i>	2
História da Evolução Farmacogenómica dos Oligonucleotídeos <i>Antisense</i>	3
Distribuição Sistémica dos Oligonucleotídeos <i>Antisense</i>	3
Aplicações Clínicas dos Oligonucleotídeos <i>Antisense</i>	3
1.Patologia nefrológica	3
a.Doença renal poliquística autossómica dominante	3
b.Doenças glomerulares	5
c.Transplante renal	7
d.Lesão renal aguda	7
e.Lesão renal crónica	8
2.Patologia neurodegenerativa	8
a.Amiloidose por transtirretina	8
b.Doença de Alzheimer	9
c.Distrofia muscular de <i>Duchenne</i>	10
d.Atrofia muscular espinhal	10
3.Doenças oncológicas	11
a.Carcinoma das células renais.....	11
b.Gliomas	11
c.Cancro da próstata	12
d.Cancro do pulmão	12
i.Cancro do pulmão de pequenas células	12
ii.Cancro do pulmão de não pequenas células.....	13
e.Cancro da mama	13
f.Cancro colo-retal	14
4.Leucemia linfocítica crónica	14
5.Doenças imunológicas	15
a.Artrite reumatóide	15
b.Doenças inflamatórias intestinais	15
6.Doenças oculares	16
Efeitos Adversos dos Oligonucleotídeos <i>Antisense</i>	17
Conclusão	18
Figuras	19
Bibliografia	27

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismo de atuação dos oligonucleotídeos *antisense*.

Figura 2. Autorradiografia de corpo inteiro de modelo animal para determinação quantitativa da distribuição sistêmica de um oligonucleotídeo *antisense*.

Figura 3. Principais patologias em que se aplicam os oligonucleotídeos *antisense*.

Figura 4. Redução da deposição glomerular de imunocomplexos de C3 na nefrite lúpica com um oligonucleotídeo *antisense*.

Figura 5. Aplicação de um oligonucleotídeo *antisense* na nefropatia diabética.

Figura 6. Redução da espessura da parede do ventrículo esquerdo após um ano de tratamento com o oligonucleotídeo *antisense* IONIS-TTRRx.

Figura 7. Oligonucleotídeo *antisense* no tratamento da distrofia muscular de *Duchenne*.

Figura 8. Alterações histológicas renais devidas à acumulação dos oligonucleotídeos *antisense* nas células do tubo contornado proximal.

Introdução

Os oligonucleotídeos *antisense* (ON) são análogos de cadeias simples de ácidos nucleicos complementares a um ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) específico (hibridização *Watson-Crick*), capazes de inibir a sua expressão e bloquear a síntese proteica.^{1;2}

Após a sua descoberta em 1978, com o objetivo de inibir o vírus do sarcoma de *Rous*, assistiu-se ao desenvolvimento de novas gerações de ON, com maior estabilidade, potência e seletividade, permitindo a sua utilização na prática clínica real.^{3;4}

Existem duas classes de ON: os dependentes da RNase H, que induzem a degradação do mRNA, e os oligonucleotídeos *steric-blocker*, que inibem o processamento do mRNA (*splicing*) ou a síntese proteica. Assim, os oligonucleotídeos *antisense* constituem uma estratégia terapêutica seletiva nas doenças em que a síntese proteica está desregulada ou resulta na isoforma proteica mutada.^{5; 6}

De uma maneira geral, os principais mecanismos de internalização dos ON nas células alvo são a endocitose adsortiva e a pinocitose de fase fluida.⁷ No que diz respeito à sua distribuição sistêmica, estudos autorradiográficos em modelos animais, evidenciaram que esta ocorre pela maioria dos tecidos (sobretudo no fígado, rins, medula óssea, adipócitos e nódulos linfáticos), com exceção do sistema nervoso central.⁸

Objetivos

Nesta revisão apresenta-se o mecanismo de atuação desta nova classe de fármacos, a evolução da farmacogenómica no seu desenvolvimento e, de modo sistemático, a aplicabilidade dos ON no tratamento da patologia renal, neurodegenerativa, hemato-oncológica e inflamatória. Também são abordados os seus efeitos adversos e as aplicações clínicas dos microRNA (miRNA) como biomarcadores de diagnóstico.

Metodologia

Esta revisão baseou-se em pesquisas nas bases de dados eletrônicas *PubMed*, *MEDLINE* e *Embase*, tendo sido selecionados artigos científicos, em português e inglês, sem restrição quanto ao ano de publicação. Recorreu-se ainda à base de dados *ClinicalTrials* (www.clinicaltrials.gov) onde estão disponíveis os registos dos ensaios clínicos a nível internacional. Foram realizadas consultas à plataforma *UpToDate*, suportada por medicina baseada na evidência (www.uptodate.com) e às orientações da Sociedade Europeia para Oncologia Médica (www.esmo.org/Guidelines). Foram ainda utilizados resumos de conferências quando eram relatados novos resultados clínicos ainda não publicados. O critério de seleção das publicações mais recentes foi a aplicabilidade à prática clínica. A última pesquisa foi realizada a 30 abril de 2018.

Não foi estabelecido nenhum contacto com investigadores científicos.

As palavras-chave utilizadas foram “*antisense oligonucleotides*”, “*cancer*”, “*clinical trials*”, “*genetic therapy*”, “*kidney*” e “*neurodegenerative*”.

Definição e Mecanismo de Atuação dos Oligonucleotídeos *Antisense*

Os ON são análogos de cadeias simples de ácidos nucleicos, complementares a um mRNA específico (hibridização *Watson-Crick*), capazes de inibir a sua expressão e bloquear a síntese proteica.^{1;2}

Existem duas classes de ON: os dependentes da RNase H, que induzem a degradação do mRNA, e os oligonucleotídeos *steric-blocker*, que inibem o processamento do mRNA (*splicing*) ou a síntese proteica. Desta forma, os ON estabelecem complementaridade com uma sequência do pré-mRNA e interferem com o *splicing* e produção proteica.^{5;7} Os mecanismos de *splicing* do mRNA constituem alvos no tratamento da distrofia muscular de *Duchenne*, talassemia β , atrofia muscular espinhal e cancro da mama.⁶

Os ON *steric blockers* impedem o início e o alongamento da síntese proteica, mas a maioria dos ON degrada uma cadeia simples de RNA pela ação da enzima RNase H. Este mecanismo pode reduzir a eficiência da tradução do mRNA e da síntese proteica em até 80 a 95%. Os ON dependentes da RNase H inibem a síntese proteica quando estabelecem complementaridade com qualquer região do mRNA, enquanto que os ON *steric-blocker* são mais eficientes quando ligados à região 5' ou ao codão de iniciação AUG do mRNA. O mecanismo pelo qual a RNase H reconhece os *duplexs* ainda não está completamente esclarecido.^{5;9} Na figura 1 encontram-se exemplificados os mecanismos de atuação das duas classes de ON.

Por sua vez, os miRNA são sequências de 18 a 22 nucleótidos não codificantes, que inibem a expressão génica. O genoma humano é regulado por mais de

2000 miRNA abundantemente expressos em quase todas as células e mais de 60% dos genes que codificam proteínas são regulados por miRNA.¹⁰ Estes podem ser usados como terapêutica seletiva, regulando determinados processos biológicos, como a apoptose, a sobrevivência e o metabolismo celular.¹¹

História da Evolução Farmacogenômica dos Oligonucleotídeos Antisense

Em 1978, foi descoberto o primeiro ON capaz de inibir o vírus do sarcoma de Rous. Em 1993, realizou-se o primeiro ensaio clínico de fase 1 em humanos. Mais tarde, em 1998, foi aprovado o fomivirsén, o primeiro ON a ser testado em fase 3, para o tratamento da retinite por citomegalovírus (CMV)³ e em 2004 surgiu o pegaptanib para o tratamento da degeneração macular.⁴ Já em 2007, foi descoberto o primeiro *splice-switching* para o tratamento da distrofia muscular de *Duchenne* e em 2013, o primeiro miRNA entrou num ensaio clínico de fase 1.³

Distribuição Sistêmica dos Oligonucleotídeos Antisense

De uma maneira geral, a entrada dos ON nas células alvo ocorre por transporte ativo, cuja eficiência depende da temperatura, da estrutura e da concentração do ON. Atualmente, acredita-se que a endocitose adsorptiva e a pinocitose de fase fluida são os principais mecanismos de internalização dos ON através da interação com um recetor de membrana.¹²⁻¹⁵ Os ON sem carga tendem a ser transportados por vetores, como os lipossomas, de maneira a aumentar a estabilidade contra as nucleases.¹⁶⁻¹⁹

Estudos autorradiográficos, em modelos animais, evidenciaram que a distribuição sistêmica dos ON ocorre pela maioria dos tecidos e sobretudo no fígado, rins, medula óssea, adipócitos e nódulos linfáticos. No entanto, estes não penetram no sistema nervoso central.⁸ A figura 2 mostra a distribuição sistêmica de um ON em modelo animal.

Aplicações Clínicas dos Oligonucleotídeos Antisense

As aplicações clínicas dos ON abordadas nesta revisão focam-se na patologia renal, neurodegenerativa, hemato-oncológica e inflamatória. As patologias abordadas encontram-se resumidas na figura 3.

1. Patologia nefrológica

a. Doença renal poliquística autossômica dominante

A doença renal poliquística autossômica dominante (DRPAD) caracteriza-se por múltiplos quistos de predomínio renal, embora também possa afetar o fígado, o pâncreas,

o baço, as vesículas seminais e a membrana aracnóideia. Podem verificar-se também alterações cardiovasculares, como os aneurismas intracranianos e o prolapso da válvula mitral, bem como hérnias da parede abdominal.²⁰

Entre as vias de sinalização celular que medeiam a formação quística destaca-se o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Os níveis elevados de angiotensina II ativam os seus recetores tipo 1 e promovem a proliferação das células epiteliais e intersticiais, com consequente formação de quistos renais. Por sua vez, a compressão renal devida à presença dos quistos ativa o SRAA. O ciclo vicioso estabelecido entre a expansão quística e a ativação do SRAA perpetua o crescimento dos quistos renais, podendo evoluir até à necessidade de terapêutica substitutiva da função renal. Estudos em modelos animais evidenciaram que a renina, a angiotensina II e o angiotensinogénio (Agt) são produzidos pelos quistos e tubos renais dilatados.²¹

De maneira a evitar a progressão desta patologia desenvolveu-se um ON dirigido ao Agt, que, apesar da sua distribuição sistémica, se encontra mais concentrado no fígado, células do tubo contornado proximal (TCP) e lesões quísticas. A administração deste ON resulta numa diminuição global dos níveis de Agt, sendo particularmente eficaz no bloqueio da sua síntese a nível renal e, sobretudo, nos TCP. Estudos em modelos animais evidenciaram que este ON reduz eficazmente a expansão dos quistos renais e constitui uma terapêutica seletiva mais eficiente do que os inibidores da enzima de conversão da angiotensina e antagonistas dos recetores da angiotensina II a reduzir os níveis de Agt e a atrasar a expansão dos quistos. Este ON dirigido ao Agt tem sido considerado relativamente seguro quando comparado com o tolvaptano, outro dos tratamentos da DRPAD, mas que se tem mostrado hepatotóxico.²¹

A expansão quística renal encontra-se associada à via de sinalização celular do Wnt, à via da adenosina 3', 5' - monofosfato cíclico e à via de sinalização da proteína alvo da rapamicina (mTOR). De facto, a via de sinalização mTOR envolvida no crescimento e proliferação celular encontra-se desregulada nestes doentes. Num estudo em modelos animais, um ON dirigido à mTOR levou a uma diminuição dos níveis da proteína mTOR, com marcada redução do volume dos quistos renais em cerca de 60% dos casos, diminuição do tamanho dos rins e normalização da função renal. O estudo mostrou ainda uma redução da proliferação das células tubulares quísticas e não quísticas, em cerca de 70% e 57%, respetivamente. Até ao momento, não existe nenhum fármaco aprovado pela administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (FDA) com eficácia comprovada na DRPAD.²²

b. Doenças glomerulares

No que toca às doenças glomerulares, os miRNA apresentam-se como candidatos a biomarcadores não invasivos do seu diagnóstico e estadiamento. Podem ser úteis para monitorizar a resposta à terapêutica ou para avaliar a progressão destas patologias. O perfil dos miRNA característico de cada patologia pode ser estudado no tecido obtido a partir de biópsia renal, permitindo descobrir novos alvos terapêuticos.²³

A nefropatia de IgA é caracterizada pela deposição de IgA no mesângio glomerular e é a glomerulonefrite primária mais comum. São fatores determinantes de prognóstico a atrofia tubular e a fibrose intersticial, reguladas pelas proteínas da família miR-200 e miR-205, que estão envolvidas na transição epitélio-mesenquimatosa (TEM). No tecido renal de modelos animais com esta patologia detetaram-se níveis elevados de miR-141, miR-205 e miR-192 e níveis reduzidos de miR-200c. Os miR-146a e miR-155 correlacionam-se inversamente com o débito de filtração glomerular (DFG) e diretamente com a proteinúria. Por sua vez, os miR-21, miR-29b, miR-29c e miR-93 estão associados à via Smad3, que regula o processo de fibrose. Inclusivamente, a sobreexpressão de miR-17 associa-se à proliferação celular. Deste modo, a determinação dos níveis de miRNA poderá ser útil para monitorizar a fibrose renal e avaliar a gravidade da doença.²³

Também a glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) cursa com esclerose glomerular, atrofia tubular e fibrose intersticial.²³ Em modelos animais com GESF mostrou-se uma associação entre o aumento da expressão de miR-193a nos podócitos glomerulares e a albuminúria, atrofia tubular e expansão quística renal. A sua desregulação leva à inibição da expressão do gene *WT1* que codifica proteínas podocitárias, como a podocalixina, a nefrina e a podocina, conduzindo ao apagamento dos processos podocitários e à destruição da sua arquitetura.²³ Apesar destas evidências, ainda não foi desenvolvido um ON específico para a GESF.

A nefrite lúpica, uma complicação comum do lúpus eritematoso sistémico, caracteriza-se pela elevada expressão do fator B do complemento, um reagente de fase aguda, cujos níveis aumentam nos processos inflamatórios desencadeados por citocinas, fatores de crescimento e proliferação bacteriana. É uma proteína crucial na ativação da via alternativa do complemento ao estabelecer ligação com o fator C3b, na superfície do agente patogénico. Estudos em modelos animais mostraram que a deficiência do fator B do complemento é um fator protetor da nefrite lúpica.²⁴

O ON seletivo para o fator B do complemento reduz os níveis do seu mRNA e os seus níveis circulantes. Na figura 4 é possível observar a redução da deposição glomerular de imunocomplexos de C3 com a administração de um ON dirigido ao fator B do complemento. Estudos em modelos animais com este ON também evidenciaram uma menor ativação da via alternativa do complemento, redução da proteinúria, regressão das

alterações histológicas renais e ainda uma maior sobrevivência dos ratos com nefrite lúpica.²⁴

Determinados miRNA interferem com os mecanismos de imunidade inata e específica. Existe um perfil de miRNAs característico dos doentes com nefrite lúpica, obtido pela biópsia do tecido renal, em que há sobreexpressão de miR-126, miR-21, miR-451, miR-223 e miR-16 e diminuição dos níveis de miR-125a-3p, miR-155 e miR-146a. Os alvos destes miRNA são genes cujas proteínas participam nas vias de sinalização MAPK/ERK (proteína cinase ativada por mitogénio e cinase regulada por sinal extracelular), que regulam as respostas imune e inflamatória. A sobreexpressão do miR-146a inibe a via de sinalização do interferão (INF) tipo I, pois este RNA de interferência reprime os genes cinase associada ao recetor de interleucina-1 (*IRAK1*), fator regulador de interferão 5 (*IRF5*) e transdutor de sinal e ativador de transcrição tipo 1 (*STAT1*). Estudos com modelos animais evidenciaram que a administração do miR-146a leva à diminuição dos níveis das citocinas inflamatórias (INF α , IL-1 β e IL-6), pelo que estes resultados poderão ter utilidade no tratamento futuro desta patologia. No entanto, esta terapêutica seletiva ainda não foi avaliada em humanos e ainda não foi desenvolvido um ON específico para a nefrite lúpica.^{23;24}

A inflamação crónica e fibrose renais típicas da nefrite lúpica levam a um aumento dos níveis do fator de transformação do crescimento (TGF β) que aumenta a expressão de miR-150 nos podócitos. Com efeito, o miR-150 poderá ser um biomarcador para monitorização dos doentes com esta patologia.²³

A nefropatia diabética é a complicação microvascular mais comum da diabetes *mellitus* tipo 1 e 2 e a principal causa de doença renal em estágio terminal. A hiperglicemia e o aumento da produção de TGF β resultam em hipertrofia mesangial, espessamento da membrana basal glomerular (MBG), fibrose túbulo-intersticial e consequente redução do DFG.²³

O recetor co-transportador de sódio-glicose 2 (SGLT2) é responsável por 90% da reabsorção da glicose filtrada. Ensaio pré-clínicos em modelos animais com o ISIS 388626, um ON dirigido ao SGLT2, evidenciaram uma redução dos níveis do mRNA do SGLT2 e, consequentemente, inibição da reabsorção renal de glicose (com glicosúria) e redução dos níveis séricos de glicose.²⁵ Na figura 5 estão esquematizados os efeitos da inibição do SGLT2 pelo ON.

Os elevados níveis de TGF β induzem a sobreexpressão de miR-192 que provoca um aumento da produção de colagénio. Estudos em modelos animais com uma terapia *antisense* dirigida a este miRNA revelaram redução do grau de proteinúria, no entanto, não houve extrapolação desta terapêutica para a prática clínica real.²³

A doença glomerular associada à síndrome de Alport resulta de mutações nos genes que codificam para as cadeias $\alpha 3$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$ do colagénio tipo IV que constitui a MBG.

As alterações da barreira de filtração glomerular conduzem a fibrose glomerular e túbulo-intersticial e inflamação renal.²⁶

Ensaio em modelos animais com a síndrome de *Alport* mostraram uma elevação dos níveis de miR-21 nos glomérulos e no compartimento túbulo-intersticial. A administração de um ON dirigido ao miR-21 levou à redução da albuminúria e dos níveis de ureia séricos. Mostrou-se, ainda, um atraso na progressão da glomeruloesclerose, com redução da espessura da MBG, e da formação de crescentes.²⁶

Estes modelos animais possuíam também níveis elevados de fibroblastos com consequente fibrose intersticial, atrofia tubular, inflamação e destruição dos capilares peritubulares. A administração do ON seletivo para o miR-21 diminuiu a extensão da inflamação, da lesão tubular, da fibrose túbulo-intersticial e os níveis de miofibroblastos e fibroblastos intersticiais.²⁶

c. Transplante renal

Um estudo com 65 biópsias de aloenxertos renais permitiu verificar que a análise do perfil dos miRNA é útil para identificar os anticorpos que medeiam a rejeição do transplante, as vias reguladoras de sinalização celular, as cascatas de inflamação e os mecanismos de imunidade celular e humoral responsáveis pela rejeição.¹⁰

O miR-210 foi validado como biomarcador de rejeição ao transplante renal, mediada por células T, após um estudo com 62 doentes que rejeitaram o transplante, 19 sem complicações pós-transplante e 13 com infeções urinárias pós-transplante. Os níveis deste miRNA estão inversamente relacionados com o DFG no primeiro ano após o transplante renal. Por outro lado, numa amostra de dez doentes com fibrose pós-transplante, verificou-se a sobreexpressão de miR-21, miR-142-5p, miR-142-3p e miR-506 e diminuição de miR-30b e miR-30c. Estes miRNA apresentam-se como alvos terapêuticos promissores no tratamento da fibrose decorrente do transplante renal, todavia, ainda não foram aprovados para utilização na prática clínica.¹⁰

d. Lesão renal aguda

A lesão renal aguda (LRA) é comum nos doentes internados em cuidados intensivos e nos recetores de aloenxertos renais. A desregulação das vias de inflamação, do ciclo celular e de determinados fatores de transcrição podem resultar numa elevada incidência de LRA.²⁷

Num estudo realizado com 42 doentes, com LRA pós-isquémica, identificou-se o miR-182-5p. Este miRNA participa na patogénese da LRA pós-isquémica uma vez que regula a apoptose, pelo oncogene Bcl-2, e a proliferação celular, pela enzima EP300. O

miR-182-5p também reduz a expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e dos inibidores das cinases dependentes das ciclinas, levando à apoptose das células epiteliais renais.¹⁰ De acordo com estudos realizados em modelos animais, a utilização de um ON dirigido ao miR-182-5p levou à alteração da expressão de 48 genes, 2 dias após a lesão isquêmica renal, e de 23 genes, 7 dias mais tarde. Esta terapia *antisense* mostrou-se eficaz na recuperação da LRA pós-transplante em modelos animais^{10;27} e a investigação científica decorre no sentido de implementar esta tecnologia na prática clínica.

e. Lesão renal crónica

Na lesão renal crónica desenvolve-se fibrose independentemente da etiologia, verificando-se um aumento do número de miofibroblastos, acumulação de colagénio, fibronectina e proteoglicanos.²⁸

O fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) é importante na patogénese da fibrose renal uma vez que aumenta a síntese da matriz extracelular e leva à perda de interação entre os pericitos renais. Os principais fatores de crescimento que estimulam a sua síntese são o TGF β , o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), a proteína Wnt, a angiotensina II, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator de crescimento derivado de plaquetas. A sobreexpressão de CTGF ocorre em várias patologias como a nefropatia diabética, a nefroesclerose hipertensiva e a glomerulonefrite cresçentica.²⁸

Ensaio clínico com um ON dirigido ao CTGF mostraram um menor grau de fibrose e uma diminuição da produção de colagénio, fibronectina e α -actina do músculo liso. A terapia *antisense* dirigida ao CTGF tem demonstrado ser mais eficaz caso a doença renal se encontre em estágio terminal. Embora não exista nenhum ensaio clínico descrito na base de dados *ClinicalTrials* acerca da aplicação clínica do FG-3019 (ON dirigido ao CTGF) nas patologias nefrológicas, um estudo em pequena escala, em doentes com nefropatia diabética, evidenciou uma redução da excreção urinária de albumina.²⁸

2. Patologia Neurodegenerativa

a. Amiloidose

A amiloidose hereditária mais comum associa-se a variantes da proteína transtirretina (TTR), resultantes de mutações do gene que codifica a TTR. A proteína não mutada (TTR *wild-type*) tem potencial amiloidogénico e está implicada na outrora conhecida por amiloidose senil.²⁹

A mutação do gene da TTR mais comum é a Val30Met e associa-se sobretudo a manifestações neuropáticas. Por sua vez, as mutações Val122Ile, Ile68Leu, Thr60Ala, Leu111Met estão mais relacionadas com o envolvimento cardíaco. Os doentes com a mutação Val30Met têm um início da patologia mais precoce, em geral antes dos 40 anos, com neuropatia sensitivo-motora e autonómica progressivas.²⁹ Esta doença também se acompanha de manifestações cardíacas, distúrbios gastrointestinais e nefropatia, podendo ser fatal em pouco mais de dez anos.^{29;30} Os tratamentos atualmente disponíveis para a doença são o transplante hepático e o tafamidis, um estabilizador da molécula de TTR.

O patisiran é um RNA de interferência que estabelece complementaridade com o mRNA da TTR, bloqueando a síntese da proteína. Esta terapêutica seletiva foi avaliada num ensaio em larga-escala, o *APOLLO*, com 225 doentes com amiloidose ATTR hereditária, que decorreu entre dezembro de 2013 e janeiro de 2016. Os resultados da fase 3 deste ensaio clínico evidenciaram uma redução dos níveis séricos da TTR superior a 85% e uma melhoria ou estabilização dos sintomas neuropáticos relativamente ao grupo placebo.³¹

O ensaio clínico de fase 3 *NCT01737398* iniciou-se em dezembro de 2012 e pretendeu avaliar a eficácia do ON IONIS-TTRRx (atualmente com o nome de inotersen) em doentes com amiloidose ATTR hereditária. Embora ainda não existam conclusões publicadas, já se encontram descritos alguns efeitos adversos como a trombocitopenia, a lesão renal rapidamente progressiva e reações nos locais de aplicação do produto. O Centro Hospitalar do Porto participou nos dois estudos com o ON na amiloidose ATTR hereditária.³²

Adicionalmente realizou-se um estudo com administração de IONIS-TTRRx a doentes com cardiomiopatia amiloidótica e insuficiência cardíaca, em que quinze doentes tinham amiloidose ATTR hereditária e sete amiloidose ATTR *wild-type*. A redução dos níveis da proteína TTR foi mais significativa nos doentes com amiloidose ATTR hereditária, mas a espessura do septo interventricular e a função sistólica global melhoraram ao fim de um ano na maioria dos doentes (figura 6). Os níveis de peptídeo natriurético cerebral também reduziram na maioria dos doentes com amiloidose ATTR hereditária. No que concerne à classe funcional da insuficiência cardíaca, esta melhorou em seis doentes, permaneceu estável em seis e agravou em três (todos com amiloidose ATTR *wild-type*). Verificou-se trombocitopenia em cerca de dois doentes com amiloidose ATTR hereditária, mas não foi registado nenhum episódio de hemorragia clinicamente significativa.³³

b. Doença de Alzheimer

Na doença de Alzheimer (DA) ocorre a clivagem da proteína precursora de amiloide, com agregação de peptídeos β -amilóide³⁰ e a acumulação da proteína Tau

hiperfosforilada nos neurónios ou nas células gliais, com um progressivo declínio cognitivo. Os ON que diminuem os níveis do mRNA que codifica a proteína Tau previnem a perda do volume do hipocampo e a morte neuronal. Contudo, uma das maiores preocupações na utilização destes ON é a contínua deposição dos agregados β -amilóide.³⁴⁻³⁶

O receptor da apolipoproteína E (ApoER2) está envolvido na potenciação a longo-termo, na aprendizagem e memória e a sua ativação requer 59 aminoácidos codificados pelo exão 19. No entanto, nestes doentes, o *splicing* do mRNA, que incluiu o exão 19, está desregulado, pelo que foi desenvolvido um ON complementar a este mRNA, com o intuito de promover a síntese da isoforma ativa do recetor. Com este tratamento, verificaram-se melhorias dos défices comportamentais, de aprendizagem e de memória. Os ON mostram-se, assim, como uma terapêutica emergente no tratamento das doenças neurodegenerativas, nomeadamente no tratamento dos défices cognitivos da DA. Todavia, ainda não estão aprovados na prática clínica real.³⁷

c. Distrofia muscular de *Duchenne*

A distrofia muscular de *Duchenne* é uma doença degenerativa muscular fatal que se deve a mutações no gene da distrofina, com produção de uma proteína de distrofina não funcional. É a forma mais severa de distrofia muscular e pode cursar com fraqueza muscular, cardiomiopatia e insuficiência respiratória. Os ON seletivos para o *splice-switching* têm como principal alvo o gene da distrofina, proteína essencial para a função muscular.³⁸

Um estudo realizado em 7 doentes que apresentavam deleções no gene da distrofina, avaliou a eficácia do ON AVI-4658, responsável pelo *skipping* do exão 51 do pré-mRNA da distrofina, e revelou que, em média, com esta terapêutica 44 a 79% das miofibrilhas tinham uma maior quantidade de distrofina. O mecanismo de ação deste ON pode ser observado na figura 7.³⁸

d. Atrofia muscular espinhal

A atrofia muscular espinhal deve-se a uma mutação pontual do gene SMN2, com a síntese de um mRNA sem o exão 7 e subsequente produção de uma proteína SMN não funcional.³⁹ Consequentemente, há uma diminuição e disfunção dos neurónios motores, fraqueza e atrofia muscular. Já numa fase mais avançada da doença, os doentes podem desenvolver insuficiência respiratória. Atualmente não existe tratamento para esta patologia, para além do alívio sintomático.⁴⁰

O nusinersen é um ON *steric-blocker* que atua no mRNA sem o exão 7, impedindo a sua tradução. Um estudo com 28 doentes com atrofia muscular espinhal, aos

quais se administrou o ON diretamente no líquido cefalorraquidiano, evidenciou que, 9 a 14 meses depois da sua administração, os níveis da proteína SMN tinham duplicado na maioria dos doentes. Inclusivamente, um ensaio clínico de fase 2 evidenciou uma evolução favorável da função motora e da sobrevida na maioria dos doentes.³⁹

3. Doenças oncológicas

a. Carcinoma das células renais

Aproximadamente 2 a 3% dos carcinomas das células renais são hereditários.⁴¹ O gene VHL, envolvido na patogénese do carcinoma das células claras esporádico e na doença de Von Hippel-Lindau, inibe a apoptose por um mecanismo dependente do oncogene Bcl-2. A sobreexpressão de Bcl-2 nesta neoplasia associa-se a uma maior resistência à quimioterapia, tornando-o no tumor sólido mais resistente a essa terapêutica.⁴²

Um ensaio clínico de fase 2, que avaliou a eficácia da associação do oblimersen, um ON dirigido ao Bcl-2, e do INF- α , evidenciou que de entre os 23 doentes envolvidos, apenas um apresentou resposta patológica completa, com uma duração de 2,5 meses. Aguardam-se os resultados da fase 3 deste ensaio clínico.⁴² Não obstante, ainda não existem ON aprovados para o tratamento do carcinoma das células renais.

b. Gliomas

De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde, os astrocitomas pilocíticos, grau 1, e os astrocitomas difusos, grau 2, referem-se a gliomas de baixo grau, enquanto os astrocitomas anaplásicos, grau 3, e os glioblastomas, grau 4, correspondem a gliomas de alto grau. Os gliomas de alto grau constituem 60% dos tumores cerebrais nos adultos, sendo o glioblastoma o mais comum, com uma sobrevida média inferior a dois anos.^{43;44} De uma maneira geral, os gliomas de alto grau não respondem à cirurgia, à radioterapia nem à quimioterapia. A ativação do recetor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-IR) promove a proliferação e sobrevivência celular e evita a apoptose das células tumorais induzida pela quimio e radioterapia. O ON específico para o IGF-IR diminui os seus níveis, promovendo a apoptose das células tumorais. A eficácia deste ON foi avaliada num estudo piloto com 12 doentes com gliomas de graus 3 e 4, sendo que dois apresentaram respostas completas e quatro respostas parciais, apesar de em quatro a doença progredir e em dois estabilizar.⁴⁵

Doentes com gliomas de alto grau expressam elevados níveis de TGF- β , que estimula a proliferação, invasão e angiogénese do tumor e potencia a sua resistência aos

mecanismos de defesa imunitária, uma vez que inibe a ativação dos linfócitos B, T, NK e diminui a produção de citocinas. Um ensaio clínico de fase 2, com 145 doentes com gliomas de alto grau, avaliou a eficácia do trabedersen, um ON específico para o mRNA do TGF- β 2. Os doentes foram divididos em 3 grupos, sendo que dois receberam o ON, a 10 μ M e 80 μ M, e o outro recebeu uma associação de vincristina, temozolamida, procarbina e lomustina. A sobrevivência dos doentes com astrocitoma anaplásico foi maior nos grupos em que foi administrado o ON. Em média, os doentes que receberam a maior dose de ON sobreviveram mais 15,5 meses do que o grupo de controlo e apresentaram, aos 12 meses, a maior taxa de resposta, controlo e redução tumoral.⁴⁴

c. Cancro da próstata

O cancro da próstata é a neoplasia mais comum no sexo masculino. Numa fase precoce, a maioria dos doentes não apresenta sintomas. Embora a urgência urinária, a noctúria e a polaquiúria sejam referidas pelos doentes, geralmente estes sintomas estão associados à hiperplasia benigna da próstata. Quase 80% dos casos são diagnosticados por biópsia prostática transretal ecoguiada.⁴⁶

As proteínas de choque térmico (Hsp) têm-se apresentado como um alvo terapêutico promissor na área oncológica. Os doentes com cancro da próstata expressam níveis elevados de Hsp27 e de clusterina, responsáveis pela progressiva resistência à castração química.⁴⁷ Estudos com culturas celulares evidenciaram que o ON dirigido ao mRNA da proteína Hsp27, OGX-427, inibe a sua síntese e induz a apoptose das células tumorais. Verificou-se ainda inibição das vias de sinalização envolvidas na progressão tumoral e uma menor resistência à castração química.⁴⁷⁻⁴⁹ Por outro lado, um ensaio clínico com o custirsén, um ON seletivo para a clusterina, revelou uma redução dos seus níveis séricos e uma maior sobrevivência dos doentes com cancro da próstata.⁵⁰

d. Cancro do pulmão

i. Cancro do pulmão de pequenas células

O cancro do pulmão de pequenas células deriva de células neuroendócrinas, tem um rápido crescimento e responde favoravelmente à quimio e à radioterapia. As *guidelines* recomendam o seu rastreio com recurso à tomografia axial computadorizada (TAC) torácica, apesar de esta estratégia não ter impacto na taxa de mortalidade.^{51,52}

O oncogene Bcl-2 é expresso em 83 a 90% dos doentes com cancro do pulmão de pequenas células e diversos estudos sugeriram que a sobreexpressão deste oncogene está implicada na resistência à quimioterapia. O oblimersén é um ON dirigido ao Bcl-2 que

atua por um mecanismo dependente da RNase H.⁵³ O ensaio clínico *NCT00005032* avaliou os efeitos da associação deste ON com paclitaxel no tratamento de doentes com neoplasia pulmonar de pequenas células quimiorresistente.⁵⁴ Apesar dos ensaios pré-clínicos terem evidenciado uma ação sinérgica entre este ON e os taxanos, os resultados deste ensaio não o demonstraram, o que se poderá dever às baixas doses de paclitaxel ou oblimersen utilizadas ou ao facto do ON não ser captado pelas células tumorais.^{53;54}

ii. Cancro do pulmão de não pequenas células

O cancro do pulmão de não pequenas células tem origem em células epiteliais, existindo três tipos: o adenocarcinoma, o carcinoma escamoso e o carcinoma de grandes células. Tal como na neoplasia de pequenas células, a TAC torácica é indicada para o rastreio desta entidade, devendo ser rastreados indivíduos entre os 55 e os 80 anos que tenham fumado 30 ou mais anos ou que tenham parado de fumar nos últimos 15 anos.⁵⁵

O inibidor da apoptose ligado ao X (XIAP) é o único inibidor de caspases e o inibidor mais potente da apoptose, bloqueando as vias apoptóticas extrínseca e intrínseca.⁵⁶ Um ensaio clínico com o ON AEG35156, dirigido ao XIAP, confirmou que este ON possui atividade anti-tumoral e aumenta a resposta dos doentes à quimioterapia. Decorrem ainda ensaios clínicos de fase 3 para avaliar a eficácia da associação deste ON com a quimioterapia em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células e ainda não existe nenhum ON aprovado para esta patologia.⁵⁷

e. Cancro da mama

A quimioterapia neoadjuvante é a primeira linha de tratamento dos doentes com cancro da mama localmente avançado. A associação de antraciclinas e taxanos induz a apoptose das células tumorais, com 5,6 a 21% dos doentes a evidenciarem uma resposta patológica completa do tumor.⁵⁸

Não obstante, estudos mostraram que a sobreexpressão do oncogene Bcl-2 nos doentes com cancro da mama pode estar associada à resistência à quimioterapia. De acordo com ensaios pré-clínicos, a associação do ON oblimersen, dirigido ao Bcl-2, com antraciclinas e taxanos mostrou ser eficaz ao induzir a apoptose das células tumorais dos doentes com esta neoplasia. Num ensaio clínico de fase 2, os doentes não evidenciaram uma taxa de resposta patológica completa do tumor na mama e nos gânglios linfáticos axilares, tendo-se observado apenas uma resposta parcial na maioria dos doentes. Os resultados mostraram ainda que a associação é bem tolerada, mas a taxa de resposta é limitada. Provavelmente, as doses e a via de administração do oblimersen utilizadas neste ensaio clínico não foram suficientes para diminuir os níveis de Bcl-2 até aos valores

pretendidos, sendo necessária mais investigação para que os ON específicos para o tratamento do cancro da mama sejam introduzidos na prática clínica real.⁵⁸

f. Cancro colo-retal

O cancro colo-retal é a segunda causa de morte nos países ocidentais, com aproximadamente 300.000 novos casos por ano nos Estados Unidos da América e na Europa. Nos últimos 15 anos, a terapia sistémica levou a um aumento da sobrevida global em, aproximadamente, 2 anos. No entanto, as opções terapêuticas para a doença refratária à quimioterapia, nomeadamente ao irinotecano, são limitadas.⁵⁹

O fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E) é um oncogene que se encontra desregulado no cancro colo-retal, sendo responsável pela regulação da tradução de vários mRNA cujas proteínas, como a ciclina D1 e a survivina, atuam como fatores de crescimento e de sobrevivência celular, promovendo a resistência à quimioterapia.⁵⁹

Um ensaio clínico com 24 doentes com cancro colo-retal refratário ao irinotecano avaliou a eficácia do ON ISIS 183750 dirigido ao eIF4E. Os níveis de mRNA do eIF4E diminuíram em 13 doentes e verificou-se uma maior resposta à quimioterapia e um atraso da progressão tumoral. No entanto, não se observaram respostas patológicas completas.⁵⁹ Apesar destes estudos, ainda não foi desenvolvido nenhum ON específico para o cancro colo-retal.

4. Leucemia linfocítica crónica

A leucemia linfocítica crónica caracteriza-se pela acumulação progressiva de linfócitos no sangue, gânglios linfáticos e medula óssea. Na maioria dos casos, o diagnóstico é incidental aquando da realização de exames de rotina. Os doentes podem sobreviver durante várias décadas, com uma evolução indolente, ou, em alguns casos, evoluir rapidamente até à morte.⁶⁰

O ensaio clínico *NCT00021749* avaliou a eficácia do oblimersen, dirigido ao Bcl-2, em doentes com leucemia linfocítica crónica avançada. Observou-se uma redução superior ou igual a 50% da esplenomegalia em 41% dos doentes, redução da linfadenopatia em 32%, declínio do total de linfócitos circulantes em 50% e resolução completa da hepatomegalia em 29% dos doentes.⁶¹ Apesar destes resultados encorajadores, ainda não foi desenvolvido nenhum ON específico para a leucemia linfocítica crónica.

5. Doenças imunológicas

a. Artrite reumatóide

A artrite reumatóide é uma poliartrite inflamatória, simétrica e periférica de etiologia desconhecida, que leva a deformidades articulares devido ao estiramento dos tendões e ligamentos e à erosão da cartilagem e do osso. Normalmente, a doença progride no sentido proximal e dentro de 10 a 20 anos os doentes podem apresentar uma incapacidade locomotora significativa, podendo apresentar também manifestações sistêmicas como mialgias, fadiga, febre, perda ponderal ou depressão.⁶²

Estudos mostraram que altos níveis da proteína C-reativa (PCR) se relacionam com o agravamento dos sintomas da artrite reumatoide, sendo que a maior atividade da doença, as alterações radiográficas e a incapacidade funcional estão associadas a altos níveis de PCR e em particular de PCR de alta sensibilidade. Efetuou-se um estudo com um ON que reduziu a quantidade de PCR de alta sensibilidade em doentes com artrite reumatóide, tendo-se registado uma diminuição dos níveis da velocidade de sedimentação, IL-6, fibrinogénio e TNF- α , pelo que, embora esta terapêutica quando avaliada em ensaios clínicos em humanos não tenha evidenciado superioridade comparativamente aos fármacos atualmente disponíveis, estes resultados poderão ter utilidade no tratamento futuro desta patologia.⁶³ Todavia, ainda não existe nenhum ON aprovado para o tratamento da artrite reumatóide.

b. Doenças inflamatórias intestinais

A doença de Crohn caracteriza-se por uma inflamação crónica transmural e segmentar, que pode afetar qualquer segmento do tubo digestivo. Por sua vez, a colite ulcerosa é uma forma de doença inflamatória intestinal confinada à camada mucosa do reto, que se pode estender à totalidade do cólon. As lesões teciduais são mediadas por citocinas inflamatórias, produzidas pelos leucócitos, e por moléculas de adesão celular, como a molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1), expressas em níveis elevados nos tecidos intestinais destes doentes.⁶⁴

O alicaforsen é um ON, cuja atividade depende da RNase H, dirigido à ICAM-1. Em dois ensaios clínicos de fase 3 este ON, em associação a corticosteroides, não se mostrou eficaz na doença de Crohn quando administrado por via oral. Por outro lado, quatro ensaios clínicos de fase 2 mostraram que o é eficaz na colite ulcerosa, quando aplicado sob a forma de enema e sobretudo nas lesões distais. A avaliação farmacocinética deste ON, nesta via de administração, evidenciou que este é eficaz a nível local e que a absorção a nível sistémico é reduzida.⁶⁴

Outro fator envolvido na patogénese destas doenças é a subunidade p65 do fator de transcrição NF κ B, que controla os genes que codificam as proteínas reguladoras da síntese das citocinas inflamatórias. Na doença de Crohn, as células endoteliais e os macrófagos intestinais têm níveis elevados desta subunidade. Um ensaio clínico com 11 doentes com doença inflamatória intestinal, resistentes à corticoterapia, avaliou a eficácia de um ON que bloqueia a síntese desta subunidade, tendo-se registado melhorias clínicas e imagiológicas em 71% dos doentes no grupo de tratamento, contra 25% nos doentes do grupo placebo.⁶⁴ Apesar destes resultados, ainda não existe nenhum ON aprovado para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

6. Doenças oculares

Os ON fomivirsén e o pegaptinib já se encontram aprovados para o tratamento da retinite por CMV e da degeneração macular da idade, respetivamente. No entanto, o glaucoma será destacado pelo facto de existirem ensaios clínicos mais recentes.

O glaucoma não é uma entidade clínica única, mas um grupo de doenças oculares com várias causas, associadas a uma neuropatia ótica progressiva que, por sua vez, pode levar à perda da função visual.^{65;66} O glaucoma é classificado como primário, quando não está associado a nenhuma doença subjacente, ou como secundário, quando resulta de outra doença ocular, de uma doença sistémica ou do uso de determinados fármacos. As alterações estruturais e funcionais da malha trabecular resultantes de um trauma, isquemia ou inflamação também podem resultar no aparecimento do glaucoma secundário, dada a acumulação de pigmento, material de esfoliação ou de glóbulos vermelhos na malha trabecular, bloqueando a saída do humor aquoso através da via trabecular.⁶⁵

O TGF- β é a principal citocina expressa no olho, encontrando-se elevada nos doentes com glaucoma, retinopatia diabética e degeneração macular relacionada com a idade. Diversos estudos mostraram que o TGF- β 2 está significativamente aumentado no corpo ciliar, no nervo ótico e na malha trabecular dos doentes com glaucoma primário de ângulo aberto. O TGF- β 2 promove a síntese da matriz extracelular da malha trabecular, bloqueia o transporte axonal e o suporte neurotrófico neuronal, induz a degeneração dos axónios do nervo ótico e aumenta a pressão intra-ocular (PIO). O ON ISTH0036, dirigido ao mRNA do TGF- β 2, bloqueia a sua síntese, tem um efeito protetor do nervo ótico e previne o aumento da PIO após a trabeculectomia. Estudos em modelos animais demonstraram que o ON tem ainda atividade anti-invasiva, anti-angiogénica e antifibrótica. Todavia, ainda não existe nenhum ON aprovado para esta patologia.⁶⁷

Efeitos Adversos dos Oligonucleotídeos *Antisense*

Ensaios em animais, como roedores e macacos, mostraram que os efeitos adversos dos ON são mais proeminentes a nível renal. Estes são filtrados a nível glomerular e rapidamente absorvidos nas células dos TCP, onde se concentram (figura 8). Os ON levam, então, à formação de grânulos basofílicos citoplasmáticos e à vacuolização do citoplasma, sobretudo nos segmentos S1 e S2 do nefrónio. O tamanho e o número dos vacúolos aumentam com a acumulação renal dos ON e, acima de 80 mg/Kg/semana, podem levar à degeneração tubular por mecanismos que ainda não estão completamente esclarecidos.⁶⁸

Após a administração do ON drisapersen em macacos, a análise histológica glomerular evidenciou uma hipertrofia das células mesangiais, inflamatórias e endoteliais. Os depósitos subepiteliais e membranosos encontrados são compatíveis com uma glomerulopatia de C3, em que há desregulação da via alternativa do complemento.⁶⁸

Conclusão

Os ON constituem uma estratégia terapêutica seletiva nas doenças cuja síntese proteica está desregulada ou resulta na isoforma proteica mutada. Decorridos 40 anos após a sua descoberta, a evolução farmacogenómica tem permitido o desenvolvimento de novas gerações de ON, com maior estabilidade, potência e seletividade, permitindo a sua utilização na prática clínica real. A aprovação da utilização clínica dos ON pelas entidades competentes data de 1998 e é do âmbito oftalmológico. Os ON têm sido utilizados em vários ensaios clínicos com evidência de eficácia no tratamento da patologia renal, neurodegenerativa, hemato-oncológica e inflamatória. São considerados ainda como uma estratégia emergente na resolução dos défices cognitivos da doença de Alzheimer e dos défices motores da distrofia muscular de *Duchenne* e da atrofia muscular espinhal. Os efeitos adversos atribuídos aos ON têm sido, consistentemente, a nefrotoxicidade, a glomerulopatia de C3 e a trombocitopenia. A obtenção do efeito terapêutico, com toxicidade mínima, requer ainda mais investimento tecnológico e consequentes custos. O desenvolvimento de ON de nova geração é o caminho certo para que os genes implicados em muitas doenças possam ser silenciados.

Figuras

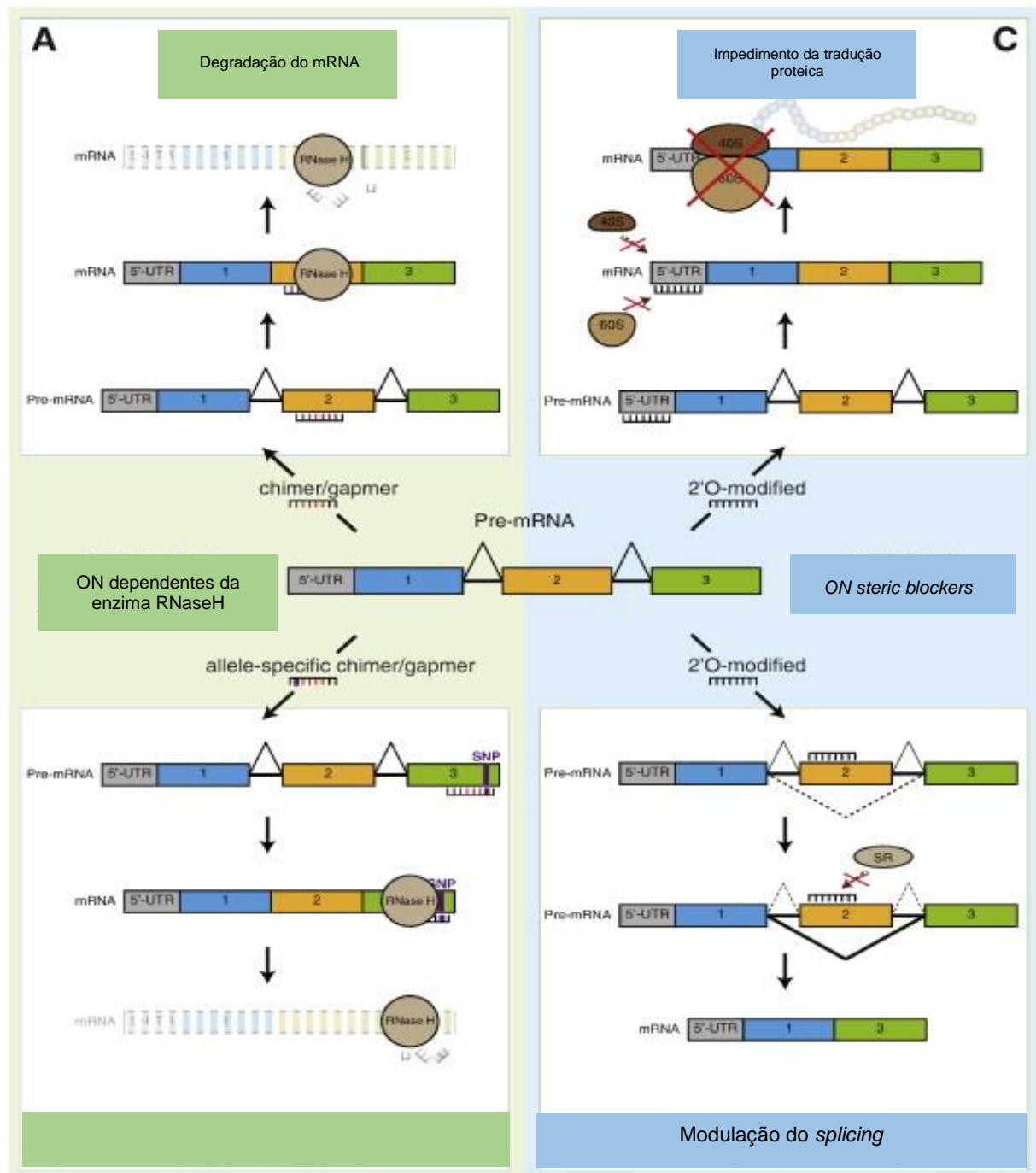


Fig.1. Mecanismo de atuação dos oligonucleotídeos *antisense*. ON: oligonucleotídeos *antisense*. Adaptada de: Evers MM, Toonen LJ, van Roon-Mom WM. *Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 87:90-103.

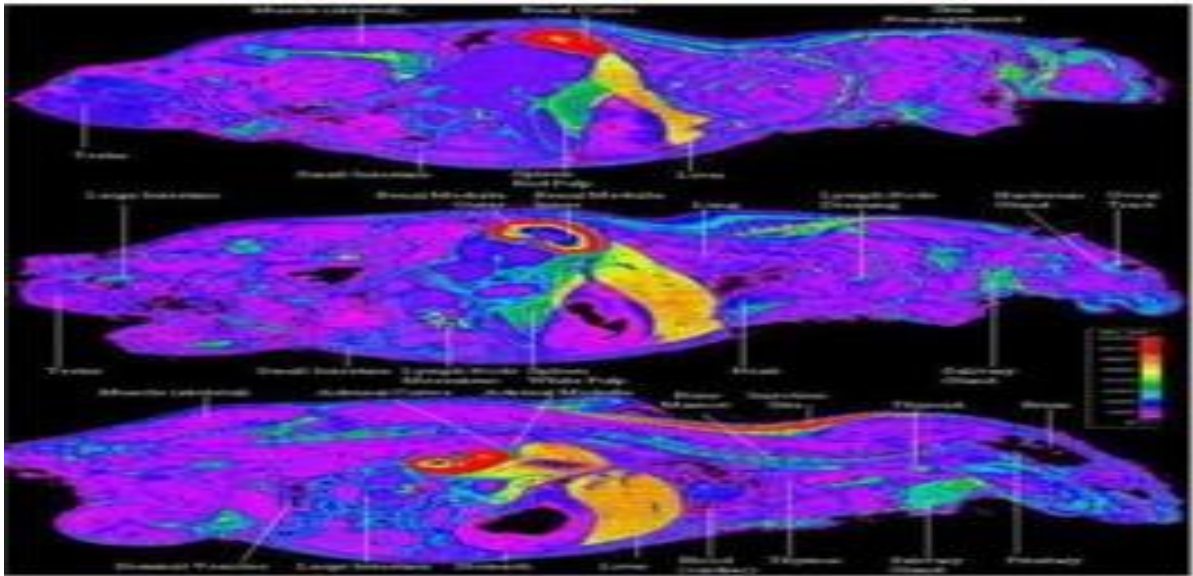


Fig.2. Autorradiografia de corpo inteiro de modelo animal para determinação quantitativa da distribuição sistêmica de um oligonucleotídeo *antisense*. In: Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. *Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides*. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015;87:46-51.

NEFROLÓGICAS

- Doença renal poliquística autossómica dominante; Doenças glomerulares; Transplante renal; Lesão renal aguda e crónica

NEURODEGENERATIVAS

- Amiloidose; Doença de Alzheimer; Distrofia muscular de *Duchenne*; Atrofia muscular espinhal

ONCOLÓGICAS

- Carcinoma das células renais; Gliomas; Cancro da próstata, pulmão, mama e colo-retal

LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRONICA

DOENÇAS OCULARES

IMUNOLÓGICAS

- Artrite reumatóide; Doenças inflamatórias intestinais

Fig.3. Principais patologias em que se aplicam os oligonucleotídeos *antisense*.

Deposição glomerular de imunocomplexos de C3

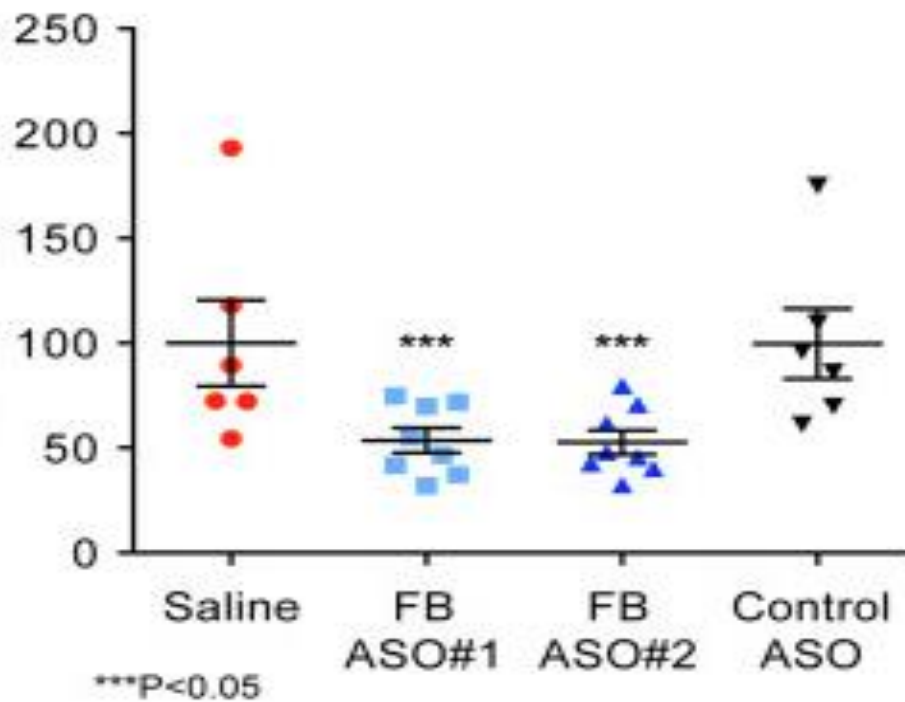
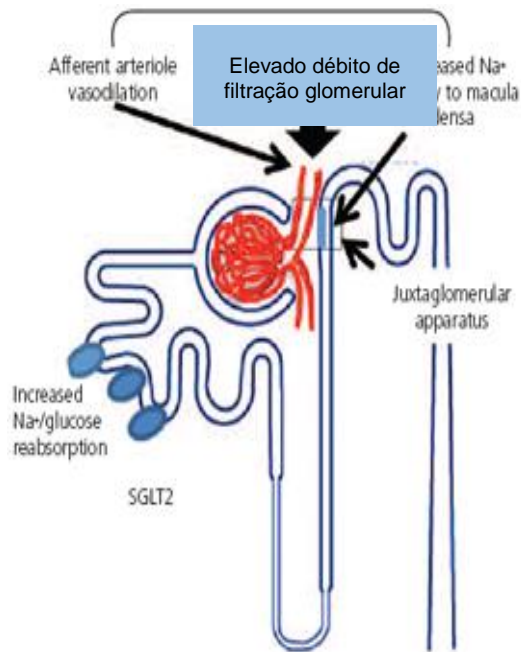


Fig.4. Redução da deposição glomerular de imunocomplexos de C3 na nefrite lúpica com um oligonucleotídeo *antisense*. Solução salina (Saline). Oligonucleotídeo *antisense* dirigido ao fator B do complemento #1 (FB ASO#1). Oligonucleotídeo *antisense* dirigido ao fator B do complemento #2 (FB ASO#2). Solução controlo (Control ASO). Adaptada de: Grossman TR, Hettrick LA, Johnson RB et al. *Inhibition of the alternative complement pathway by antisense oligonucleotides targeting complement factor B improves lupus nephritis in mice. Immunobiology.* 2016;221(6):701-8.

a. Fase precoce da nefropatia diabética



b. Inibição do recetor co-transportador de sódio-glicose 2

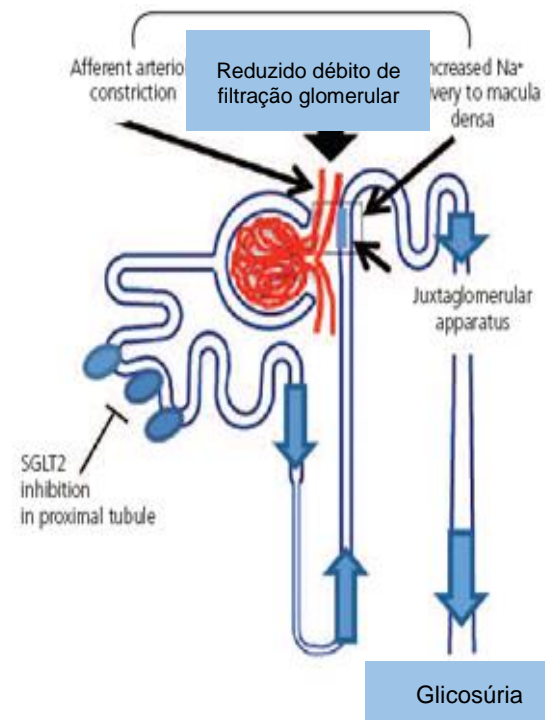


Fig.5. Aplicação de um oligonucleotídeo *antisense* na nefropatia diabética. a. Fase precoce da nefropatia diabética. b. Inibição do recetor co-transportador de sódio-glicose 2. Adaptada de: Maltese G A-SA, Gnudi L, Karalliedde JL. Preventing diabetic renal disease: The potential reno-protective effects of SGLT2 inhibitors. *British Journal of Diabetes and Vascular Disease*. 2015;15(3):114-8.

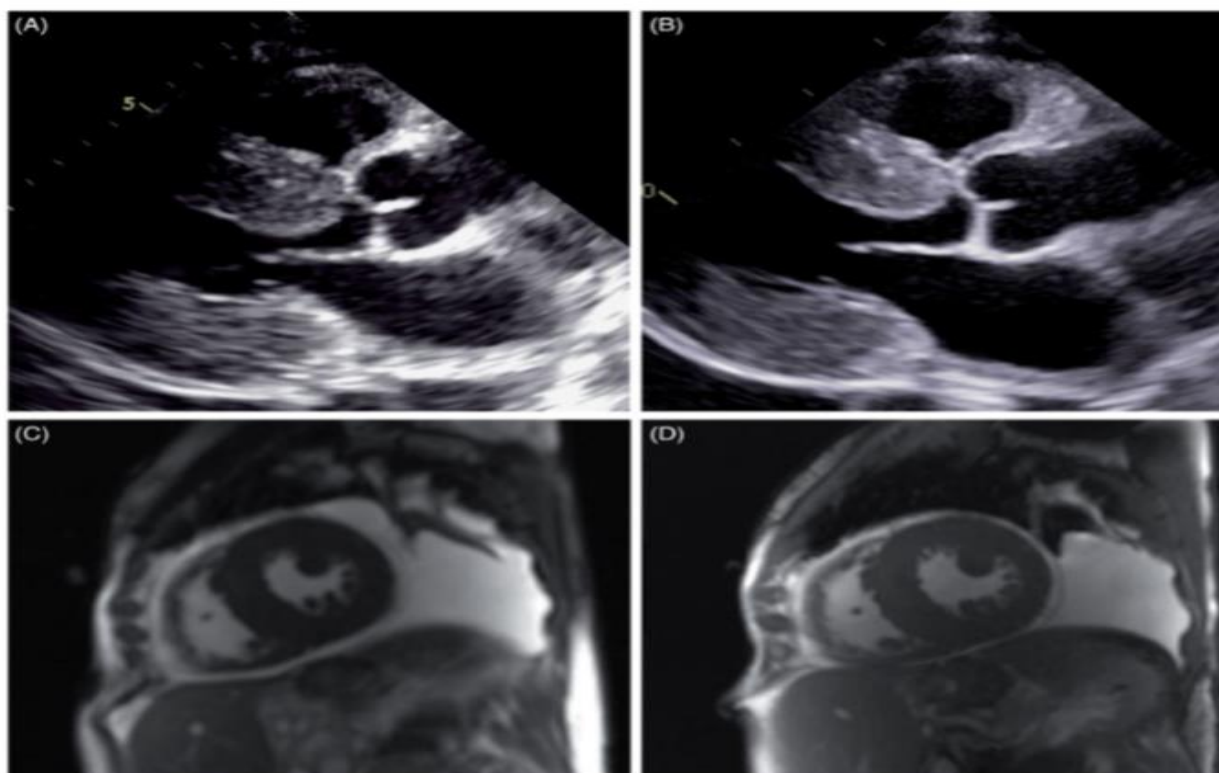


Fig.6. Redução da espessura da parede do ventrículo esquerdo após um ano de tratamento com o oligonucleotídeo *antisense* IONIS-TTRRx. Ecocardiograma transtorácico: início do tratamento (A) e 1 ano depois (B). Ressonância magnética nuclear: início do tratamento (C) e 1 ano depois (D). *In: Benson MD, Dasgupta NR, Rissing SM, et al. Safety and efficacy of a TTR specific antisense oligonucleotide in patients with transthyretin amyloid cardiomyopathy. Amyloid. 2017;24(4):217-23.*

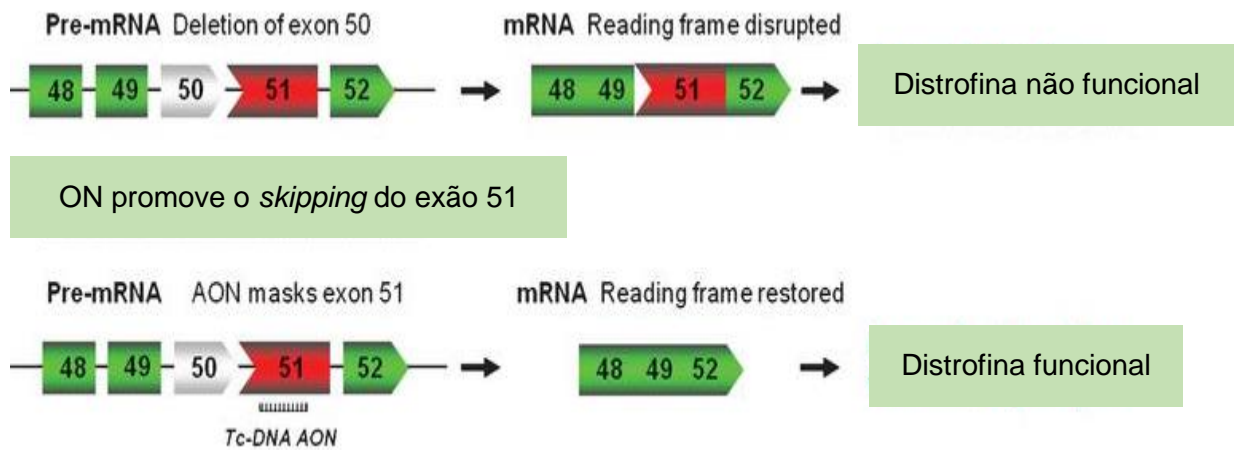


Figura 7. Oligonucleotídeo *antisense* no tratamento da distrofia muscular de *Duchenne*. Adaptada de: Goyenvallé A, Leumann C, Garcia L. *Therapeutic Potential of Tricyclo-DNA antisense oligonucleotides*. *Journal of neuromuscular diseases*. 2016;3(2):157-67.

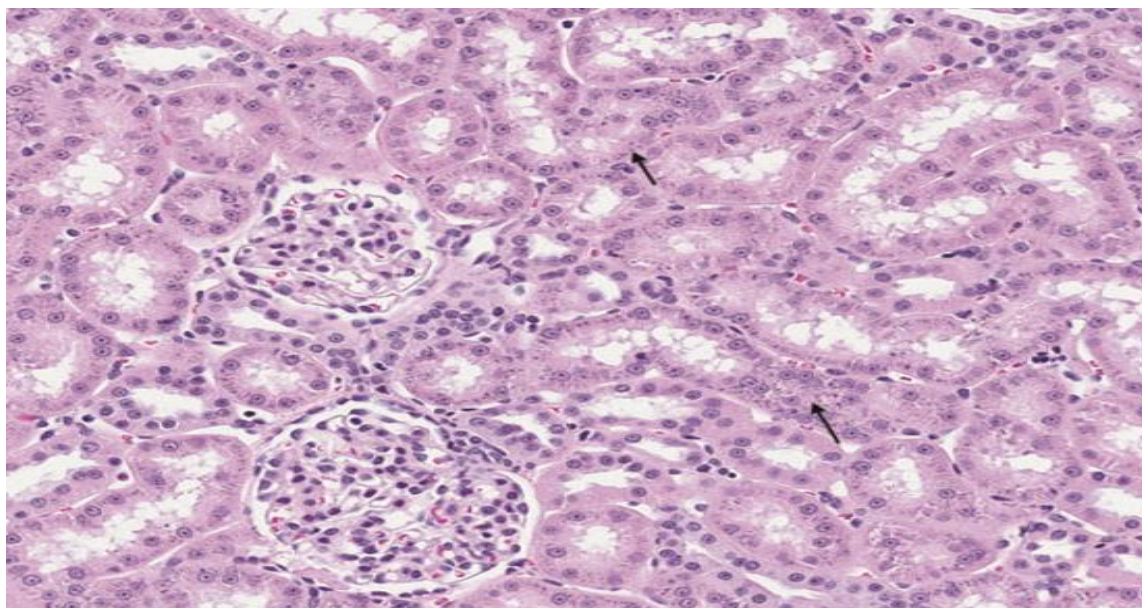


Fig.8. Alterações histológicas renais devidas à acumulação dos oligonucleotídeos antisense nas células do tubo contornado proximal. *In: Engelhardt JA. Comparative Renal Toxicopathology of Antisense Oligonucleotides. Nucleic acid therapeutics. 2016;26(4):199-209.*

Bibliografia

1. Dias N. Minireview: Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. American Association For Cancer Research. 2002;347-55.
2. Evers MM, Toonen LJ, van Roon-Mom WM. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;87:90-103.
3. Lundin KE, Gissberg O, Smith CI. Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Hum Gene Ther.* 2015;26(8):475-85.
4. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Jr. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2004;351(27):2805-16.
5. Watts JK, Corey DR. Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. *J Pathol.* 2012;226(2):365-79.
6. Pan Q, Shai O, Lee LJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet.* 2008;40(12):1413-5.
7. Alter J, Lou F, Rabinowitz A. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med.* 2006;12(2):175-7.
8. Geary RS, Norris D, Yu R. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2015;87:46-51.
9. Larrouy B, Blonski C, Boiziau C. RNase H-mediated inhibition of translation by antisense oligodeoxyribonucleotides: use of backbone modification to improve specificity. *Gene.* 1992;121(2):189-94.
10. Wilflingseder J, Reindl-Schwaighofer R, Sunzenauer J. MicroRNAs in kidney transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2015;30(6):910-7.
11. Barata P, Sood AK, Hong DS. RNA-targeted therapeutics in cancer clinical trials: Current status and future directions. *Cancer Treatment Review.* 2016;50:35-47.
12. Loke SL, Stein CA, Zhang XH. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989;86(10):3474-8.
13. Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989;86(17):6454-8.
14. Vlassov VV, Balakireva LA, Yakubov LA. Transport of oligonucleotides across natural and model membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1197(2):95-108.
15. Bennett CF, Chiang MY, Chan H. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol.* 1992;41(6):1023-33.
16. Ma DD, Wei AQ. Enhanced delivery of synthetic oligonucleotides to human leukaemic cells by liposomes and immunoliposomes. *Leuk Res.* 1996;20(11-12):925-30.
17. Farhood H, Serbina N, Huang L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1235(2):289-95.
18. Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem.* 1994;269(4):2550-61.
19. Fraley R, Straubinger RM, Rule G. Liposome-mediated delivery of deoxyribonucleic acid to cells: enhanced efficiency of delivery related to lipid composition and incubation conditions. *Biochemistry.* 1981;20(24):6978-87.
20. Solazzo A, Testa F, Giovanella S. The prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): A meta-analysis of European literature and prevalence evaluation in the Italian province of Modena suggest that ADPKD is a rare and underdiagnosed condition. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190430.
21. Saigusa T, Dang Y, Mullick AE. Suppressing angiotensinogen synthesis attenuates kidney cyst formation in a Pkd1 mouse model. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2016;30(1):370-9.
22. Ravichandran K, Zafar I, He Z. An mTOR anti-sense oligonucleotide decreases polycystic kidney disease in mice with a targeted mutation in Pkd2. *Hum Mol Genet.* 2014;23(18):4919-31.

23. Schena FP, Sallustio F, Serino G. microRNAs in glomerular diseases from pathophysiology to potential treatment target. *Clinical Science (London)*. 2015;128(11):775-88.
24. Grossman TR, Hettrick LA, Johnson RB. Inhibition of the alternative complement pathway by antisense oligonucleotides targeting complement factor B improves lupus nephritis in mice. *Immunobiology*. 2016;221(6):701-8.
25. Van Meer L, Moerland M, van Dongen M. Renal Effects of Antisense-Mediated Inhibition of SGLT2. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics*. 2016;359(2):280-9.
26. Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J Clinical Investigation*. 2015;125(1):141-56.
27. Wilflingseder J, Jelencsics K, Bergmeister H. miR-182-5p Inhibition Ameliorates Ischemic Acute Kidney Injury. *American Journal of Pathology*. 2017;187(1):70-9.
28. Falke LL, Goldschmeding R, Nguyen TQ. A perspective on anti-CCN2 therapy for chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014;29(suppl_1):i30-i7.
29. Ando Y, Coelho T, Berk JL. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet Journal of Rare Disease*. 2013;8:31.
30. Farr SA, Erickson MA, Niehoff ML. Central and peripheral administration of antisense oligonucleotide targeting amyloid-beta protein precursor improves learning and memory and reduces neuroinflammatory cytokines in Tg2576 (AbetaPPswe) mice. *J Alzheimers Dis*. 2014;40(4):1005-16.
31. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan W. Patisiran, an Investigational RNAi Therapeutic for Patients with Hereditary Transthyretin-Mediated (hATTR) Amyloidosis with Polyneuropathy: Results from the Phase 3 APOLLO study (CT.001). *Neurology*. 2018;90(15 Supplement).
32. Ensaios clínicos do IONIS-TTR (RX). Disponível em: <http://ttrstudy.com/ensaios-clinicos-ionis-ttrrx/?lang=pt-pt>. Consultado pela última vez a 2017/04/24
33. Benson MD, Dasgupta NR, Rissing SM. Safety and efficacy of a TTR specific antisense oligonucleotide in patients with transthyretin amyloid cardiomyopathy. *Amyloid*. 2017;24(4):217-23.
34. DeVos SL, Miller RL, Schoch KM. Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Science Translational Medicine*. 2017;9(374).
35. Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*. 1984;225(4667):1168-70.
36. DeVos SL, Goncharoff DK, Chen G. Antisense reduction of tau in adult mice protects against seizures. *J Neurosci*. 2013;33(31):12887-97.
37. Hinrich AJ, Jodelka FM, Chang JL. Therapeutic correction of ApoER2 splicing in Alzheimer's disease mice using antisense oligonucleotides. *EMBO Mol Med*. 2016;8(4):328-45.
38. Kinali M, Arechavala-Gomeza V, Feng L. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *The Lancet Neurology*. 2009;8(10):918-28.
39. Wood MJA, Talbot K, Bowerman M. Spinal muscular atrophy: antisense oligonucleotide therapy opens the door to an integrated therapeutic landscape. *Hum Mol Genet*. 2017;26(R2):R151-r9.
40. Miller CM, Harris EN. Antisense Oligonucleotides: Treatment Strategies and Cellular Internalization. *RNA Disease*. 2016;3(4).
41. Escudier B, Porta C, Schmidinger M et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2016;27(suppl_5):v58-v68.

42. Margolin K, Synold TW, Lara P. Oblimersen and alpha-interferon in metastatic renal cancer: a phase II study of the California Cancer Consortium. *J Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007;133(10):705-11.
43. Up to Date - Classification and pathologic diagnosis of gliomas. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/search?search=Malignant+astrocytomas&x=0&y=0>. Consultado pela última vez a 2017/04/24.
44. Hau P, Jachimczak P, Bogdahn U. Treatment of malignant gliomas with TGF-beta2 antisense oligonucleotides. *Expert Review Anticancer Therapy*. 2009;9(11):1663-74.
45. Andrews DW, Resnicoff M, Flanders AE. Results of a Pilot Study Involving the Use of an Antisense Oligodeoxynucleotide Directed Against the Insulin-Like Growth Factor Type I Receptor in Malignant Astrocytomas. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;19(8):2189-200.
46. UptoDate - Clinical presentation and diagnosis of prostate cancer. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-and-diagnosis-of-prostate-cancer#H2>. Consultado pela última vez a 2017/04/26.
47. OGX-427 in Castration Resistant Prostate Cancer Patients. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01120470?term=Antisense+oligonucleotides&rank=44>. Consultado pela última vez a 2017/04/26.
48. Chi KN, Yu EY, Jacobs C. A phase I dose-escalation study of apatorsen (OGX-427), an antisense inhibitor targeting heat shock protein 27 (Hsp27), in patients with castration-resistant prostate cancer and other advanced cancers. *Ann Oncol*. 2016;27(6):1116-22.
49. Cystic fibrosis: Genetics and pathogenesis. Disponível em: http://www.uptodate.com/contents/cystic-fibrosis-genetics-and-pathogenesis?source=search_result&search=Cystic+fibrosis&selectedTitle=7~150. Consultado pela última vez a 2017/04/24
50. Blumenstein B, Saad F, Hotte S. Reduction in serum clusterin is a potential therapeutic biomarker in patients with castration-resistant prostate cancer treated with custirsen. *Cancer Medicine*. 2013;2(4):468-77.
51. Vachani A, Moon E, Wakeam E. Gene therapy for lung neoplasms. *Clin Chest Med*. 2011;32(4):865-85.
52. Früh M, De Ruyscher D, Popat S. Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2013;24(suppl_6):vi99-vi105.
53. Rudin CM, Otterson GA, Mauer AM. A pilot trial of G3139, a bcl-2 antisense oligonucleotide, and paclitaxel in patients with chemorefractory small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2002;13(4):539-45.
54. Effect of Mipomersen on LDL-Cholesterol Levels in Patients Treated by Regular Apheresis (MICA). Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01598948?term=Antisense+oligonucleotides&rank=60>. Consultado pela última vez a 2017/04/27.
55. Cancer.Net - Lung Cancer - Non-Small Cell Guide. Disponível em: <http://www.cancer.net/cancer-types/lung-cancer-non-small-cell/screening>. Consultado pela última vez em 2017/04/27
56. A Phase 1-2 XIAP Antisense AEG35156 With Carboplatin and Paclitaxel in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00558922?term=Antisense+oligonucleotides&rank=78>. Consultado pela última vez em 2017/04/27.
57. Dean E, Jodrell D, Connolly K. Phase I trial of AEG35156 administered as a 7-day and 3-day continuous intravenous infusion in patients with advanced refractory cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(10):1660-6.
58. Moulder SL, Symmans WF, Booser DJ. Phase I/II study of G3139 (Bcl-2 antisense oligonucleotide) in combination with doxorubicin and docetaxel in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(23):7909-16.

59. Duffy AG, Makarova-Rusher OV, Ulahannan SV. Modulation of tumor eIF4E by antisense inhibition: A phase I/II translational clinical trial of ISIS 183750-an antisense oligonucleotide against eIF4E-in combination with irinotecan in solid tumors and irinotecan-refractory colorectal cancer. *Int Journal Cancer*. 2016;139(7):1648-57.
60. UptoDate - Patient education: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) in adults (Beyond the Basics). Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/chronic-lymphocytic-leukemia-cll-in-adults-beyond-the-basics>. Consultado pela última vez em 2017/04/28.
61. O'Brien SM, Cunningham CC, Golenkov AK. Phase I to II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Journal Clin Oncol*. 2005;23(30):7697-702.
62. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(16):3622-34.
63. Warren MS, Hughes SG, Singleton W. Results of a proof of concept, double-blind, randomized trial of a second generation antisense oligonucleotide targeting high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research Therapy*. 2015;17:80.
64. Marafini I, Di Fusco D, Calabrese E. Antisense approach to inflammatory bowel disease: prospects and challenges. *Drugs*. 2015;75(7):723-30.
65. Lewis TB, H.; Bartlett, J. et al. Optometric Clinical Practice Guideline Care of the patient with open angle glaucoma - Optometric Clinical Practice Guideline Care of the patient with open angle glaucoma. *Healthy People 2010 Vision*.
66. Casson RJ, Chidlow G, Ebner A. Translational neuroprotection research in glaucoma: a review of definitions and principles. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2012;40(4):350-7.
67. Hasenbach K, Van Bergen T, Vandewalle E. Potent and selective antisense oligonucleotides targeting the transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in advanced glaucoma: a preclinical evaluation. *Journal for Modeling in Ophthalmology*. 2016(2):20-8%V 1.
68. Engelhardt JA. Comparative Renal Toxicopathology of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2016;26(4):199-209.